

厚生科学研究費補助金
ヒトゲノム・再生医療等研究事業

肝細胞移植系の確立と肝幹細胞の分離
および培養に関する研究

平成 15 年度 総括・分担研究報告書
主任研究者 宮島 篤
平成 16 (2004) 年 3 月

目 次

I	総括研究報告	
	肝細胞移植系の確立と肝幹細胞の分離および培養に関する研究に関する研究	
	宮島 篤	1
II	分担研究報告	
1	肝細胞培養系と人工肝臓モデル作成に関する研究	
	酒井康行	10
2	ES細胞からの肝細胞文化系に関する研究	
	渡部徹郎	19
III	研究成果の刊行に関する一覧表	21
IV	研究成果の刊行物・別刷	24

I. 総括研究報告

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
総括研究報告書

肝細胞移植系の確立と肝幹細胞の分離および培養に関する研究

主任研究者 宮島 篤 東京大学分子細胞生物学研究所・教授

研究要旨： 肝臓の再生医療にとり、機能的な肝細胞を大量に調製することは重要な課題である。しかし、成体肝細胞の培養はごく短期間のみ可能であり、長期間の培養では肝機能の著しい低下を招く。一方、無限増殖可能な不死化肝細胞株ではほとんどの肝機能が失われている。このように、肝細胞の分化と増殖とは相反する関係にあり、肝細胞の増殖と分化を人為的にコントロールする方法の開発が必要とされている。そのためには、我々は増殖能の高い胎児期の未分化肝細胞の増殖・分化機構の解析を進めている。我々はこれまでに胎生肝細胞に発現する抗原 Dlk を使って未分化肝細胞が分離できることを示した。そこで、この細胞の分化に対する Notch シグナルの作用を解析し、Notch の活性化により、肝細胞分化が抑制され胆管上皮細胞への分化が促進されることを明らかにした。また、未分化肝細胞はオンコスタチンM (OSM) の存在下で培養することで、機能的な肝細胞へと効率するので、この系を使って、jmj や C/EBPa などの遺伝子機能解析を行い、これらが肝細胞分化に必須であることを示した。さらに、肝再生過程における OSM の機能を検討し、OSM は肝障害時における肝細胞の細胞死を抑制するとともに肝非実質細胞からの TIMP の発現を誘導することにより組織の再構築にも寄与することが明らかとなった。

分担研究者

酒井康行

東京大学生産技術研究所 化学工学 助教授

渡部徹郎

東京大学大学院医学系研究科 分子病理学

助手

A.研究目的

肝臓は成体における最大の代謝器官であり、エネルギーの代謝や貯蔵、胆汁の生産、毒物の無毒化や異物の除去など生命維持に必須の役割を担っている。そのため、様々な原因による肝炎の進行によ

り、重篤な機能不全に陥った場合には、生体肝移植しか有効な治療法がないのが現状である。しかしながら、移植においては絶対的なドナー不足および組織適合性の問題があり、これに替わる有効な治療法あるいは補助する方法の開発が急務となっている。その一つが、生体外で肝細胞を増やし、細胞移植、遺伝子治療あるいは人工肝臓に利用しようというものである。しかしながら、成体肝臓の肝細胞は休止期にありほとんど増殖しない。成体肝細胞の培養はごく短期間のみ可能であり、長期間の培養では肝機能の著しい低下を招く。一方、無限増殖可能な不死化肝細胞株ではほとんどの肝機能が失

われている。このように、肝細胞の分化と増殖とは相反する関係にあり、肝細胞の増殖と分化を人為的にコントロールする方法の開発が肝機能を備えた細胞を大量に調製するためには必須である。そのためには、未分化肝細胞が発生・増殖・分化するプロセスを細胞・分子レベルで十分に理解する必要がある。

我々はこれまでに増殖能の高い胎生期の未分化肝臓細胞に着目し、この細胞を生体外で培養し分化誘導することに成功している。すなわち、胎生肝細胞を IL-6 ファミリーのオンコスタチン M (OSM) の存在下で培養することで、未熟な肝細胞を機能的な肝細胞へと効率良く分化させることを明らかにしてきた。この系は、上記の肝細胞分化のメカニズム解明に適しており、OSM の分化に対する作用を詳細に調べることにより、肝細胞の分化機構を理解し、それを制御するための知見を蓄積することを目指す。また、OSM は胎生期のみならず、成体マウスの肝傷害時にも誘導されることが明らかとなっていることから、肝再生過程においても肝細胞の増殖、分化を制御しているものと考えられた。そこで、OSM の成体肝臓の再生における役割を検討した。

一方、肝細胞のもととなる肝幹細胞を未分化状態に保ちながら増殖させる技術の開発は肝臓の再生医療にとり極めて重要な課題である。これまでに様々な臓器、器官での幹細胞の存在が提唱されている。血液細胞においては、血液幹細胞の研究が数多くの研究者によって精力的に進められた結果、マウスではたった 1 個の血液幹細胞が体内のすべての血液細胞を再構成させるに至っている。しかしながら、肝幹細胞は肝細胞と胆管上皮細胞への分化能を備えた増殖性の細胞とされているが、その研究は血液幹細胞等に比べて著しく遅れており、その実態は不明である。

その理由として未分化状態の肝細胞を分離する方法が確立していないことがあげられる。未分化肝細胞の抗原の検索から、未分化肝細胞の分離に使える抗体を調製することにより、肝幹細胞の分離が可能となれば、胎生肝臓のみならず再生肝や肝臓以外の組織中の体性幹細胞から未分化肝細胞の同定や分離に応用することができる。さらには、あらゆる細胞への分化能を有する胚性幹 (ES) 細胞から肝細胞の方向へと分化した細胞を分離することにも応用できる。これらの知見を基に胎生期の未分化肝臓細胞の増殖期間をできるだけ延長し、細胞を十分量確保した後分化誘導して大量の機能的肝細胞を調製する方法の確立を目指す。

生体から分離可能な未分化肝細胞には限りがあり、医療目的には大量の未分化あるいは成熟した肝細胞を調製する必要がある。そのためには、ES 細胞から肝細胞への分化誘導系が確立できれば、機能的肝細胞の大量調製が容易となり、細胞移植のみならず人工肝臓の素材として最適である。ES 細胞は主に LIF (白血球阻止因子) の作用により、その多分化能を保っており、LIF 非存在下で外胚葉、中胚葉、内胚葉の細胞へと分化していく。生体内では肝細胞は内胚葉に由来する細胞から発生してくるため、*in vitro* においても、内胚葉へ効率良く誘導することが肝細胞の調製に有効であると考えられる。そのために内胚葉由来臓器の形成・分化に重要な TGF- β ファミリーを介したシグナル伝達経路をマウス ES 細胞で操作することで、肝細胞を作り出すための最適条件を検討する。その際、肝細胞の分化段階に応じて発現するマーカー遺伝子をレポーター系として ES 細胞に導入し、肝細胞へと分化した細胞の量的 (誘導

性) および質的 (分化度) な評価を同時に行なう。マーカー遺伝子としては α フェトプロテイン、アルブミン、TAT を予定している。このようにして得られた知見をいずれはヒト ES 細胞の肝細胞分化系へと応用する。特にヒト ES 細胞から機能的肝細胞を得られれば、細胞移植や人工肝臓の実用化に大きく寄与することとなる。

また、肝臓移植では、つなぎの医療として肝臓機能を代替する再構築型臓器の開発が望まれる。組織再構築に適した力学的特性を持つ生分解ポリマーで細胞を担持する多孔質部と内部を貫通する血管網ネットワークを合せ持つ再構築用のテンプレートを作製し、これに機能肝細胞培養技術を組み合わせ、小動物の肝臓機能代替に十分な大きさの肝組織を再構築しモデル動物への移植実験で評価する。

以下は本研究代表者の研究内容であり、分担者の研究内容については「分担者の研究報告」で述べる。なお、本研究での肝幹細胞と肝再生に関する研究は神奈川科学技術アカデミーとの共同研究によるものである。

B. 研究方法

1. 胎仔肝初代培養系を使った分化機構の解析

胎生肝臓は胎生後期における最も中心的な造血器官として機能するが、消化器官としての機能はほとんどもたない。そこで、肝細胞の消化器官へと分化するメカニズムをマウス胎生肝臓の初代培養系を用いて検討した。

我々はすでに、OSM が未分化肝細胞の分化を誘導し、チロシンアミノトランスフェラーゼ (TAT) やグルコース 6 リン酸ホスファターゼ (G6Pase) など出生時期に発現する酵素やグリコーゲンの蓄積

や脂肪合成などの機能が *in vitro* で発現されることを見いだしている。このシステムの優れた点は一個体のマウス胎児肝臓の培養が可能であり、遺伝子欠損により胎生致死となる変異マウスの肝臓を使った培養も可能となることである。致死的なノックアウトマウスで肝臓に異常を示すものはすでに数多く報告されているが、致死であるために、その遺伝子の肝臓分化における機能の解析が困難である場合が多い。そこで、このシステムを変異マウスの解析に応用した。

2. 肝幹細胞の分離と培養

肝幹細胞は肝細胞と胆管上皮細胞に分化する能力を備えた増殖性の細胞と考えられているが、その性状はほとんど知られてはいない。マウスの胎生肝臓で発現している抗原の検索から Dlk という膜タンパク質が未分化肝細胞に発現しており、これに対する抗体を使って肝幹細胞を分離することができることを神奈川科学技術アカデミーの研究グループが明らかにしている。そこで、このシステムを使って胎生肝細胞の分離を行い、その性状を解析した。とりわけ、分離した未分化肝細胞の分化能を *in vitro* で検討した。

3. 再生のメカニズム

肝臓は様々な原因による障害から再生することが知られているユニークな組織である。この再生過程と肝臓の発生・分化の過程との類似が以前から指摘されている。事実、我々は OSM が胎仔肝のみならず、成体においても肝障害時に一過的にその発現が上昇することを見いだしている。さらに、四塩化炭素投与による肝再生モデルを我々が作製した OSM 受容体ノックアウトマウスに適用して、

OSM の肝再生における役割を検討した。とりわけ、肝非実質細胞における OSM の機能を解析した。

成体肝臓は肝実質細胞とともに非実質細胞である類洞内皮細胞、星細胞、クッパー細胞等から形成されている。肝障害時におけるクッパー細胞以外の肝非実質細胞の役割に関しては明確にはされていない。とりわけ、肝臓細胞の約10%を占める内皮細胞の性状は不明である。内皮細胞を高純度に分離する方法も確立していない。そこで、我々は肝内皮細胞を細胞膜抗原の発現を基に分離し、遺伝子発現プロファイルを SAGE (serial analysis of gene expression) 法による解析から、内皮細胞に特異的に発現する遺伝子の同定を行った。

C. 結果

1. 胎仔肝初代培養系における肝細胞分化機構の解析

すでに、我々は本培養系においては OSM により活性化された STAT3 が種々の肝代謝酵素の発現誘導およびサイクリン D の発現抑制に必要であること K-Ras が E-cadherin を介する細胞接着に必要であることなどを示した。そこで、今回は遺伝子欠損により肝臓に異常を示し、しかも致死となる変異マウスにおける肝細胞の増殖・分化能の検討を行った。

AT rich DNA 結合ドメイン様構造をもつ jumonji (jmj) は転写制御因子と考えられているが、その欠損は胎生致死となる。胎児肝臓での造血が低下していることから、このマウスの肝臓について検討した。すでに造血細胞自体には異常が認められないことが示されており、肝臓細胞に異常がある可能性が考えられた。そこで、このマウスの肝臓細胞を詳細に検討した

ところ、jmj は未分化肝細胞ではほとんど発現しておらず、分化・成熟に伴い発現が増強することが明らかになった。

jmj 欠損マウス胎児肝細胞の増殖を MTT 法にて検討したが、野生型と同程度の増殖能を示した。一方、OSM による分化誘導条件下においても、jmj 欠損肝細胞は TAT などの代謝酵素を発現することができなかった。以上の結果から、jmj は肝細胞の分化に重要な機能を果たしていると考えられた。

C/EBP α 欠損マウスは出生後 8 時間までに、代謝異常による低血糖症と高アンモニア症により死亡する。胎児肝臓の培養系にて、分化能を検討したところ、C/EBP α 欠損肝細胞は *in vitro* での分化能を示さず、C/EBP α をレトロウイルスベクターで発現することで分化能を回復した、したがって、C/EBP α は肝細胞の分化に必須であることが培養系にて示された。すでに、STAT3 が肝細胞分化に必須であることを見いだしており、STAT3 と C/EBP α との関係を現在検討している。

2. 肝幹細胞の分離と培養

胎児肝臓中の Dlk 陽性細胞が肝細胞と胆管上皮細胞とに分化する能力があることは *in vitro* で示されており、Dlk 陽性細胞は肝幹細胞を含むと考えられている。この Dlk 陽性細胞の分化機構についての検討を行った。肝内胆管の形成に異常を示す Alagille 症候群の原因遺伝子が Notch のリガンドの Jagged-1 であることが知られている。胎児の肝臓における Notch とそのリガンドの発現を調べたところ、肝細胞には Notch2 が発現しており、門脈周辺の細胞に Jagged-1 が発現していることが明らかとなった。そこで、Jagged-1 発現細胞に接触する未分化肝細胞が胆管

上皮細胞へと分化する可能性を *in vitro* で検討した。すなわち、Dlk 陽性細胞を胎児肝臓から分離し、Notch の活性化型である Notch 細胞内ドメインをレトロウイルスベクターにて発現したところ、肝細胞への分化が抑制され、逆に胆管上皮細胞のマーカー遺伝子の発現が促進された。したがって、Dlk 陽性の未分化肝細胞が Notch シグナルにより胆管上皮細胞への分化が誘導される可能性が示唆された。

3. 再生のメカニズム

四塩化炭素の腹腔内投与による急性肝傷害モデルでは、肝傷害により OSM の発現は非実質細胞で誘導され、その受容体は実質細胞で誘導されることを明らかにしている。このことから、肝再生時には、非実質細胞から実質細胞への OSM のパラクリン機構が働いていることが示唆されていた。さらに、OSM 受容体のノックアウトマウスでは肝再生が顕著に遅延しており、OSM が肝細胞増殖／細胞死抑制に直接作用することが示されていた。

肝再生の過程では一過性にマトリクスメタロプロテアーゼにより細胞結合組織が分解され、肝細胞の増殖に伴い再構築される。四塩化炭素投与した OSM 欠損マウスではプロテアーゼ活性が昂進しており細胞結合組織の破壊が認められた。この結合組織の破壊と再構成には非実質細胞が関与することが考えられるので、非実質細胞に対する OSM の作用を検討した。

非実質細胞には OSM 受容体の発現が認められたが、IL-6 受容体の発現はほとんどみられなかった。OSM は分離した非実質細胞に Matrics Metalloproteinase

(MMP)の阻害因子である Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1)の発現を誘導したが、IL-6 にはそうした活性が認められなかった。したがって、OSM は肝再生過程の組織再構築にも積極的に関与していることが示唆された。

IL-6 も OSM と同様に肝再生に重要な機能があるとされていた。事実、肝細胞に対しては、OSM と IL-6 はほぼ同等の作用を示した。一方、非実質細胞に対しては OSM のみ TIMP の誘導活性を示した。

さらに、肝臓の非実質細胞画分から FcR 陽性細胞を分離することで内皮細胞が高純度で得られた。そこで、この細胞を用いて、SAGE およびマイクロアレイによる遺伝子発現解析を行い、肝類洞内皮細胞に特異的に発現する遺伝子の検索を行った。現在、抗体を作製し肝類洞内皮細胞を純化することを試みており、正常肝臓と四塩化炭素による傷害肝臓から類洞内皮細胞を分離して、傷害により発現が変動する遺伝子の同定を行う予定である。

D. 考察

胎生肝臓の初代培養系は *in vitro* で肝細胞分化を誘導することが可能であり、このシステムを使うことで、肝細胞分化の分子機構の解析が可能である。本研究では、個体発生に必須である *jmj* や C/EBP α 遺伝子が肝細胞分化に重要であることを *in vitro* で示した。*jmj* は胎生肝細胞の増殖よりはむしろ分化誘導に重要であるとの結果を得た。しかし、最近 *jmj* が細胞増殖に重要な D サイクリンの発現を抑制するとの報告があること、また *jmj* の肝細胞における発現が分化とともに増加することから、*jmj* が D サイクリンの発現を制御している可能性もあり、この点は今後検討する必要がある。

Dlk が未分化肝細胞を分離するマーカーとなること、Notch のシグナルが hepatoblast の胆管への分化に重要であることが Dlk 陽性細胞を使って示された。このように Dlk を使って未分化肝細胞を分離することにより、従来、分子機構の解析がほとんどなされていなかった肝幹細胞の研究を推進することが可能となった。今後、さらに詳細な分子機構の解析が進むことが大いに期待される。しかし、Dlk 陽性細胞は均一な細胞集団とは考えにくく、今後さらに未分化肝細胞マーカーを検索し、細胞の分離に利用可能な抗体を作製することで肝幹細胞の解析を進めたい。

近年、肝発生の極く初期段階においては、内皮細胞の存在が重要であるという報告がなされた。また、肝再生過程に、類洞内皮細胞を含む肝非実質細胞の重要性が示された。肝幹細胞と同様に、類洞内皮細胞も十分に純化されておらず、その性状の分子レベルでの解析はなされていない。今後は、類洞内皮細胞に特有の抗原を使った高重度の細胞集団を得て、その肝発生および肝障害時における機能を検討していきたい。

E. 結論

我々が開発した胎生肝臓の培養系は遺伝子ノックアウトマウスの解析に適用することで、個体発生に必須の遺伝子の肝臓形成における機能の解析が可能となる。また、Dlk 抗体による未分化肝細胞の分離は肝細胞あるいは胆管上皮細胞の初期分化の分子機構の解析に極めて有効であることが示された。OSM 受容体ノックアウトマウスでの肝再生の研究から OSM の肝非実質細胞における新たな機能が明らかになった。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- N. Tanimizu, M. Nishikawa, A. Miyajima (2003) Isolation of hepatoblasts based on the expression of Dlk/Pref-1. *J. Cell Sci.* 116: 1775-1786.
- H. Anzai, A. Kamiya, H. Shirato, T. Takeuchi, A. Miyajima. Impaired differentiation of fetal hepatocytes in homozygous *jumonji* mice. *Mech. Dev.* 120, 791-800, 2003.
- M. Tanaka, Y. Hirabayashi, T. Sekiguchi, T. Inoue, M. Katsuki, A. Miyajima. Targeted disruption of Oncostatin M receptor results in altered hematopoiesis. *Blood* 102, 3154-3162, 2003.
- M. Tanaka, A. Miyajima. Oncostatin M, a multifunctional cytokine. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 149, 39-52, 2003.
- S. Hanada, H. Kayano, J. Jiang, N. Kojima, A. Miyajima, A. Sakoda, Y. Sakai. (2003) Enhanced in vitro maturation of subcultivated fetal human hepatocytes in three dimensional culture using poly-L-lactic acid scaffolds in the presence of oncostatin M. *Int J Artif Organs.* 26(10):943-951.
- K. Nakamura, H. Nonaka, H. Saito, M.

- Tanaka, A. Miyajima. (2004) Hepatocyte proliferation and tissue remodeling is impaired after liver injury in oncostatin M receptor knockout mice. *Hepatology* 39: 635-644.
- K. Nakamura, A. Miyajima . Oncostatin M promotes differentiation of fetal hepatocytes in vitro and regulates liver regeneration in vivo. *Frontier in hepatology: growth/differentiation and hepatocyte/HCC*. (K. Okita Ed. Springer-Verlag) in press.
- A. Rump, Y. Morikawa, M. Tanaka, S. Minami, N. Umesaki, M. Takeuchi, A. Miyajima. (2004) Binding of ovarian cancer antigen CA125/MUC16 to mesothelin mediates cell adhesion. *J. Biol. Chem.* 279(10):9190-9198
- N. Tanimizu. A. Miyajima. Notch signaling controls hepatoblast differentiation by altering the expression of liver-enriched transcription factors. *J. Cell Sci.* in press
2. 学会発表
- 1) Minoru Tanaka
Targeted disruption of Oncostatin M receptor results in altered hematopoiesis
 Challenges in the era of stem cell Plasticity (03.04.10 Providence, USA)
- 2) Hidenori Nonaka, Takashi Sekiguchi, Sumio Sugano, Atsushi Miyajima
Gene expression profiles of endothelial cells isolated from normal and injured mouse liver
 EMBO workshop on Liver Development, Gene Regulation and Disease
 (03.6.14~6.19, Heraklion, Crete, Greece)
- 3) 中村康司, 野中秀紀, 齊藤弘樹, 田中 稔, 宮島 篤
Oncostatin M is a key regulator of liver regeneration
 EMBO workshop on Liver Development, Gene Regulation and Disease
 (03.6.14~6.19, Heraklion, Crete, Greece)
- 4) 谷水直樹, 齊藤弘樹, 宮島 篤
Dlk/Pref-1, a cell surface protein with EGF-like repeats, is a useful marker for the isolation of hepatoblasts from mouse fetal liver
 EMBO workshop on Liver Development, Gene Regulation and Disease
 (03.6.14~6.19, Heraklion, Crete, Greece)
- 5) Nobuhiko Kojima, Duen-yau Chuang, Nobuyoshi Shiojiri, Atsushi Miyajima
Regulation of C/EBP α Transcriptional activity by STAT3
 EMBO workshop on Liver Development, Gene Regulation and Disease
 (03.6.14~6.19, Heraklion, Crete, Greece)
- 6) 宮島 篤
Liver development and hematopoiesis
 Wilsede Meeting. XV
 (03.6.17, Wilsede, Germany)
- 7) Atsushi Miyajima, Naoki Tanimizu, Takaaki Matsui, Minoru Tanaka, Koji Nakamura

Role of Cytokines for Development and Regeneration of Liver

the American Society for Cell Biology
Summer meeting "Signal Transduction
Determining the Fate of Stem Cells"
(03.8.9~8.12 Bozeman, Montana U.S.A)

8) 宮島 篤, 中村康司, 谷水直樹, 安西弘子, 田中 稔

肝幹細胞と肝臓の発生・分化・再生
第 7 回 Molecular Cardiovascular
Conference

(03.9.5~7, 北海道余市郡赤井川村
キロロホテルピアノ)

9) 宮島 篤, 野中秀紀, 田中 稔, 中村康司

肝再生過程におけるオンコスタチン
Mの役割

第 24 回日本炎症・再生医学会
(03.11.26~2, 国立京都国際会館, 京都)

10) Atsushi Miyajima, Ken-ichi Minehata,
Masaki Takeuchi, Takahashi Sekiguchi,
Yoko Hirabayashi, Peter J Donovan, Toru
Inoue, Takahiko Hara

Roles of Oncostatin M for homeostasis
of bone marrow hematopoiesis

American Society of Hematology 45th
Annual Meeting
(03.12.6~12.9 San Diego CA, U.S.A.)

11) 谷水直樹, 宮島 篤

Notch シグナルによる肝芽細胞の分
化制御

第 26 回 日本分子生物学会年会
(03.12.10~13 神戸国際展示場、他)

12) 陳 彦榮, 関根圭輔, 深水昭吉,
宮島 篤

マウスの胎仔肝臓における Cyclin D
の制御機構の解析

第 26 回 日本分子生物学会年会
(03.12.10~13 神戸国際展示場、他)

H. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

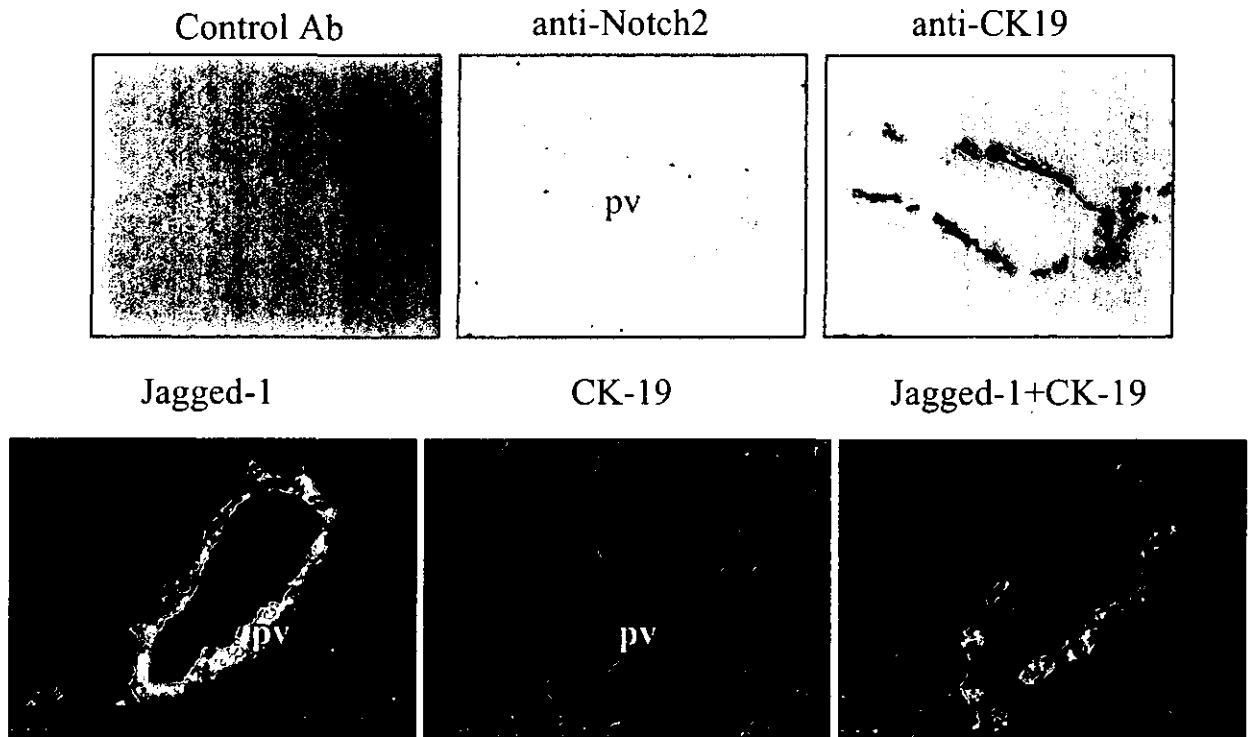


図1 胎児肝臓におけるNotch とJaggedの発現
 Notoch 2は肝細胞に発現しており、Jaggedはportal veinの周辺でのみ発現が認められる。

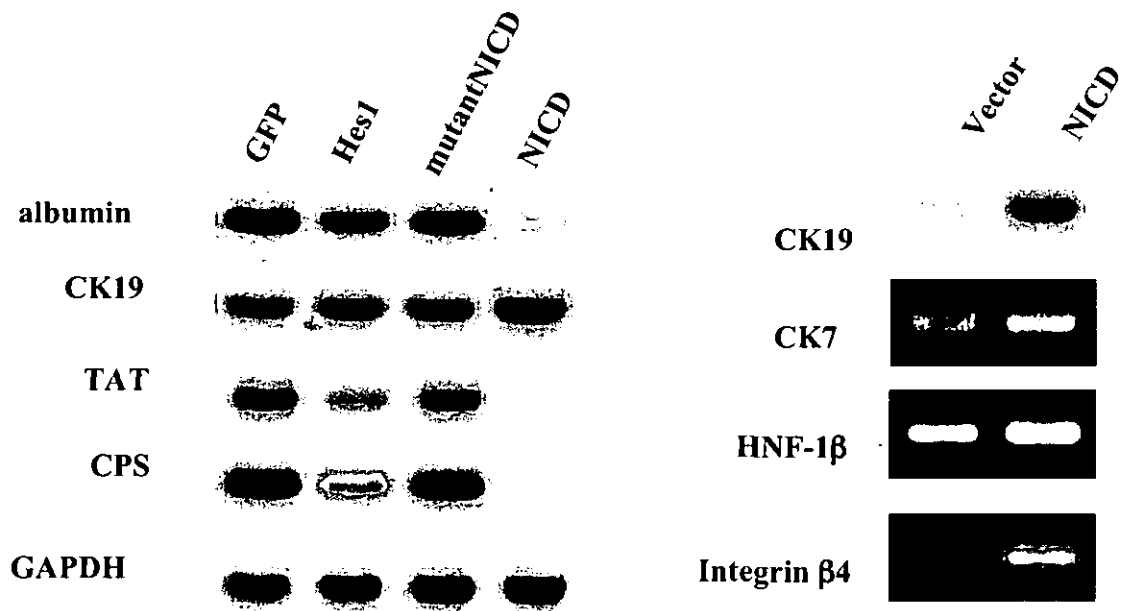


図2 未分化Dlk陽性細胞の分化におけるNotchシグナルの作用
 Notoch の細胞内ドメイン(NICD)をDlk陽性細胞に発現しすると、肝細胞マーカーの発現が低下し、胆管上皮細胞のマーカーの発現が誘導される。

II. 分担研究報告

厚生科学研究費補助金（ゲノム・再生医療研究事業）

分担研究報告書

肝細胞培養系と人工肝臓モデル作成に関する研究

分担研究者 酒井 康行 東京大学生産技術研究所・助教授

研究要旨： 肝組織の *in vitro* 再構築を最終目的として、第一に、シート積層・機械造型併用法にて作製した担体を *in vitro* 灌流培養（ヒト肝ガン由来細胞）によって評価した。その結果、 1.3 cm^3 という極めて小さな体積の組織においても、少なくともマクロ流路構造の配備が肝由来細胞の増殖と機能発現にとって必須であることが確認できた。しかし、その機能レベルからはより細かな流路配備の必要性が示唆された。第二に、血管縫合を伴う再構築型肝組織の *in vivo* 性能評価が可能なラットにおいて、マウスで確立した *in vitro* の培養条件が有効に働くかを否かを検証した。マウスで用いてきた NA/DMSO/OSM の添加と PLLA 多孔質担体を用いる三次元培養とが、同様に優れた効果を持つことを確認したが、マウスに比べて分化誘導はやや劣り、培養条件の改善の必要性が示唆された。

A. 研究目的

近年、生体組織工学やそれを利用した再生医療に関する研究が活発化しているが、具体的な展望を描ける対象は、皮膚や軟骨など比較的二次元的な構造を持つ組織・臓器のみである。一方、肝臓や腎臓・肺などのある程度の体積と高度に組織化された内部構造や毛細血管系を持つ実質臓器については、どのように再構築を進めるかについても未だ具体的なめどは全く立っていない。

そこで本研究では、*in vitro* で肝組織を再構築することを最終目的とし、生体吸収性樹脂（ポリ乳酸、PLLA）から

なる複雑な内部構造をもつ臓器テンプレート作製の研究と、肝前駆細胞の *in vitro* 増殖分化制御に関する研究、の2方面から検討を進めてきた。前年度までに、前者に関しては、シート積層と機械加工を併用する新たな造型プロセスを確立した。後者においては、マウス胎児由来の肝前駆細胞集団を *in vitro* で三次元的に分化させる培養条件を確立し、そのような前培養が *in vivo* 移植後の組織再構築に非常に望ましい効果を与えることを示してきた。

これらの成果を受け今年度は、シート積層・機械造型併用法にて作製した

担体を *in vitro* 灌流培養（ヒト肝ガン由来細胞）によって評価することを第一の目的とした (B)。また、血管縫合を伴う再構築型肝組織の *in vivo* 性能評価が可能なラットにおいて、マウスで確立した *in vitro* の培養条件が有効に働くかを否かを検証することを第二の目的とした (C)。

動物を用いる実験は、東京大学生産技術研究所・動物実験委員会に提出して承認された動物実験計画書に従って行った。

B. 三次元造型した担体の *in vitro* 灌流実験による性能評価

B-1. 方法

前年度に作製した体積約 1.33 cm³ の内部マクロ流路構造を持つ PLLA 多孔質担体を用いた。これは、一辺 3 mm の正四面体を積み重ね、その斜辺を流路（全て内径 500 μm）とすることで、各 1 つずつの入口と出口を持ち、内部で合流分岐構造をもつものである。この担体の外表面をシリコンゴムで覆うことで、モデル肝組織とした (図 1)。使用前に内表面のコラーゲン被覆を行った。

これを含む簡単な灌流培養回路を作成し (図 1)、ヒト分化型肝ガン由来の Hep G2 細胞 9 日間の連続培養を行った。培養液は、DME+10%-FBS を用いた。細胞播種はモデル肝組織の両端に細胞懸濁液を含むし臨時を 2 つ接続し、往復させることで担体内部に均一に細胞を分布させた後に、一晚回転培養器でゆっくりと回転を行うことで細胞を内表面に付着させた。培地体積は、3 日までが 10 mL、3-7 日が 20 mL、7-9 日が 40 mL とし、2 日ごとに培地交換を行った (回路内の交換不可能や体積約 5 mL の除く)。灌流流速は、1-3 日が 0.02 mL/min で開始し、2 日ごとに倍増させた。培地中のグルコースやアルブミンの変化を測定した。

比較のために、流路加工を施さない同じ大きさの担体を用いた灌流培養、12 穴プレートを用いる単層培養、同じ構造を持つ薄層ディスク状の PLLA 多孔質体（直径 10 mm、厚さ 1.5 mm）の振盪培養、など計 4 群を比較した。

B-2. 結果および考察

グルコース消費については、流路構造を持つ担体での培養が最も高い値を示したが、流路構造を持たない担体での培養では、顕著な細胞増殖は 9 日まで見られなかった (図 2 A)。アルブミン分泌についても、流路構造の有無が発現レベルに大きな影響を与えた。すなわち、流路有りでは顕著な上昇をみたが、流路無しでは 9 日まで非常に顕著な増加は見られなかった (図 2 B)。一方、流路有りで見られた発現レベルは単層培養と同程度であり、薄層ディスク PLLA には及ばなかった。

以上、このような小さなスケールにおいても、マクロ流路構造の配備が、肝由来細胞の増殖と機能発現にとって必須であることが明らかとなった。しかしながら、機能発現レベルは、物質交換がほぼ理想的であると考えられる PLLA 薄層ディスクには及ばなかった。定常状態における担体内部の酸素濃度分布は、酸素の拡散と細胞による消費とから簡単に見積もることができる。この結果、もし生体肝と同じく 5×10^8 cells/cm³-tissue 程度の高密度組織を目標とすると、細胞が酸素不足で死に至らないようにするためには、全ての細胞をマクロ流路内壁から 70 μm 以内に配置する必要がある。もし生体内の 1/10 の細胞密度としても、その大きさは 200 μm 程度である。今回のデザインではその最大距離は 1150 μm となっており、細胞が増殖するに連れて明らかに酸素不足となる領域が存在してしまうこととなる。今後、このようなさらに小さな流路構造を持った担体を実際に製作するために、より微細かつ精度

の高い加工手法を導入する必要があるであろう。

C. ラット胎児肝細胞の *in vitro* 分化誘導

C-1. 方法

ラット胎児肝細胞分画中の肝前駆細胞のポリ乳酸スポンジによる三次元培養は、マウスで用いてきた従来の方法に従った。すなわち、妊娠 14 日の C57Br/6 マウスから採取した胎児肝細胞分画を、上記で用いたものと同じ製法にて製作したポリ乳酸スポンジ（直径 10 mm, 厚さ 2 mm, 体積約 0.1 cm³）中で、2 週間培養を行った。培養液は、William's E 培地に血清やアスコルビン酸二リン酸、増殖因子・ホルモン、ニコチンアミド (NA, 1 mM)・ジメチルスルフォキシド (DMSO, 1%)・オンコスタチン M (OSM, 10 ng/mL) を加えたものを用いた。

単層培養はコラーゲン被覆表面で、三次元培養は、従来用いてきたポリ乳酸多孔質担体（直径 10 mm, 厚さ 1.5 mm）を用い、マウス胎児肝細胞と同様な手法で行った。機能は、アルブミン合成能 (ELISA 法)、チトクローム P450 1A1/2 活性 (エトキシレゾルフィン脱エチル化 (EROD) 活性)、また、培養終了時に培養系の DNA 量を DAPI 蛍光法にて測定し、別途行った初代培養成熟ラット肝細胞と、単位 DNA 量当たりの機能比較を行った。

C-2. 結果および考察

単層培養 (Run-1) においては、NA/DMSO 系および NA/DMSO/OSM 系で小型肝細胞の選択的増殖が確認できた (図 3)。また、その一部は例えば胆管様構造を形成し始めるなどのより高度な分化形態を示した (図 4)。しかし、マウスで見られたようにこれらの小型肝細胞が培養表面の 60-70% を覆うまでには増殖せず、おおよそ 20-30% 程度の増殖に留まった。培地中へのアルブミン分泌からは、確かに

NA/DMSO/OSM 系で最も高い発現が得られた (図 5)。以上、マウスと比較すると不十分ではあるものの、マウス胎児肝細胞で確立してきた培養液が、ラット胎児肝細胞においても同様に前駆細胞集団の選択的増幅と分化にとって、好影響を持つことが確認できた。

同じ培養液を用いて、PLLA 薄層ディスクを用いる三次元振盪培養を行い、同様の機能解析を行った (Run-2)。培養系全体としての培地中へのアルブミン分泌は、(図 6)、マウスでの結果と異なり、NA/DMSO/OSM 系と Basal と間に有意な差異は見られなかった。一方、EROD 活性については、三次元培養の効果および NA/DMSO/OSM 添加の効果は、それぞれ顕著に観測された (図 7)。

培養終了時 (4 週間後) に細胞を回収しその DNA を測定、単位 DNA 量当たりの機能を見ると、三次元培養および NA/DMSO/OSM 添加の効果は、アルブミン分泌には差異が見られなかったが、EROD には顕著な影響が見られた (図 8)。

以上の検討より、ラット胎児肝細胞においても、アルブミン分泌・EROD 活性ともに、NA/DMSO/OSM 添加の三次元培養にて、肝前駆細胞の選択的増殖と成熟化を著しく促進することができた。しかし、培養系全体でみた機能発現は、マウスと比べて緩やかであったこと、また実験毎に図 4 のような高度な分化形態の出現確率が異なることなどから本条件には改善の余地があることが示唆される。

マウスでは、単層培養・PLLA 培養とも、不溶性のマトリックス物質の豊富な蓄積が肉眼でも容易に確認できるが、ラットの場合にはそのような現象は確認されなかった。これはマウスとラットとの違いの一例であるが、今後、両者の挙動の差異に着目することで、ラットにおいても安定した前駆細胞集団の増幅・成熟化が行えるようになるこ

とが期待される。

D. まとめと今後の展望

第一の目的であるマクロ流路構造の *in vitro* 灌流培養における細胞増殖およびその機能発現への影響確認については、 1.3 cm^3 という小さな組織においても、少なくともマクロ流路構造の配備が有効であることが確認できた。しかし、最終到達密度や機能は、物質交換が理想的に行われる PLLA 薄層ディスクの振盪培養には及ばなかった。内部の酸素濃度分布の評価からは、*in vivo* 肝組織の 1/10 の細胞密度を目標としたとしても、単位正四面体の一辺を 400 mm 程度にまで小さくする必要がある。このような微細加工を脆弱な PLLA・塩複合体に機械加工にて施すことは不可能であるため、例えばレーザー加工の導入などを行う必要があるだろう。

第二の目的であるラット胎児肝に含まれる肝前駆細胞の選択的増幅と分化誘導については、マウスで用いてきた NA/DMSO/OSM の添加の効果が EROD 活性には顕著に見られたが、アルブミン分泌にはみられなかった。また三次元培養の効果も同様に EROD で顕著にみられアルブミンでは見られなかった。マウス胎児肝細胞と比較すると、小型の肝細胞集団の出現確率は半分以下であり、胆管ネットワーク様構造などのより高度な分化を示す細胞は少なかった。また実験毎のバラツキがマウスと比較して大きいなど、ラット肝前駆細胞についてはさらに培養条件の改善が必要であった。

以上本年度は、マクロ流路を配備した担体における灌流培養の優位性を示し、当面のモデル動物となるラットにおいても、確立してきた培養手法が不十分ながらも同様に適用できることを明らかとした。また、以上の3年間の成果を通じて、未だ最適ではないが微細構造をもつ三次元担体と肝前駆細胞

の選択的増幅・分化誘導に関して有用な知見を得ることが出来た。

今後は、これらの知見を、門脈・下大静脈間への血管吻合を前提とした移植デバイスの製作・*in vitro* 組織育成へと融合利用し、肝不全ラットに移植、そこでの経験を *in vitro* の改善へとフィードバックすることで、少なくともラットレベルにおいて、このような工学的に再構築された肝組織の機能代替の可能性をしていきたいと考えている。

E. 健康危険情報

特になし

F. 研究発表

1. 論文発表

- Cultivation and induction of fetal liver cells in poly-L-lactic acid scaffolds: J. Jinlan, N. Kojima, A. Miyajima, W Yan, Y. Sakai: *Mat. Sci. Eng. C*, in press (2004).
- A novel poly-L-lactic acid scaffold that possesses a macroporous structure and a branching/joining three-dimensional flow channel network: Its fabrication and application to perfusion culture of human hepatoma Hep G2 cells: Y. Sakai, M. Otsuka, S. Hanada, Y. Nishiyama, Y. Konishi, A. Yamashita: *Mat. Sci. Eng. C*, in press (2004).
- Ultra-violet-light irradiation-based photo-fabrication that simultaneously produces a macroporous structure and flow channels using a photo-reactive biodegradable polymer and a gas-forming azoamide compound: Y. Sakai, M. Otsuka, J. Kozasa, F. Miyata, K. S. Furukawa, A. Yamashita: *Biochem. Eng. J*, in press (2004).
- Efficacy of engineered liver tissue based on poly-L-lactic acid scaffolds and fetal mouse liver cells cultured with oncostatin M, nicotinamide and dimethyl sulfoxide: J.

Jiang, L. Guo, N. Kojima, K. Naruse, M. Makuuchi, A. Miyajima, W.-Q. Yan, Y. Sakai: *Tissue Eng.*, in press (2004).

- Enhanced in vitro maturation of subcultivated fetal human hepatocytes in three dimensional culture using poly-L-lactic acid scaffolds in the presence of oncostatin M: Hanada S., Kayano H., Jiang J., Kojima N., Miyajima A., Sakoda A. and Sakai Y.: *Int. J. Artif. Organs*, 26(10), 943-951 (2003).
- 三次元造型の再生医療への利用：酒井康行：再生歯科医療学会誌, 1(1), 12-21 (2003).
- マイクロファブリケーション・三次元造型 (3.8, 分担執筆)：図解 再生医療工学 (田中順三・立石哲也編), 工業調査会 (東京), 印刷中(2004).

2. 学会発表

- 生体吸収性多孔質担体を用いた三次元灌流培養によるヒト胎児肝細胞の分化誘導：花田三四郎・萱野寛美・酒井康行・小島伸彦・宮島篤：化学工学会・群馬大会 (水上), 2003.7.
- ポリ乳酸三次元多孔質体を用いたヒト胎児肝細胞の灌流培養：花田三四郎, 迫田章義, 酒井康行：第41回日本人工臓器学会大会 (仙台), 2003.10.
- 三次元合流分岐流路ネットワークを配備した肝組織再構築用担体のデザインと造型：酒井康行, 大塚崇年, 西山裕司, 小西義幸, 花田三四郎, 山下明泰：第41回日本人工臓器学会大会 (仙台), 2003.10.
- Induction of Selective Propagation and Maturation of Fetal Rat Liver Cells In Vitro: Jinlan JIANG¹, Nobuhiko KOJIMA, Atsushi MIYAJIMA, Weiqun YAN and Yasuyuki SAKAI: The Sixth

International Conference and Exposition of the Tissue Engineering Society International (Orlando, Florida), 2003.12.

- 肝組織再構築に向けたラット胎児肝細胞の in vitro 成熟化誘導：Jiang Jinlan, 萱野寛美、小島伸彦、宮島篤、Yan Weiqun, 酒井康行：第3回日本再生医療学会総会 (千葉), 2004.3.
- 肝組織再構築のための生体吸収性樹脂担体のデザインと三次元微細造型：大塚崇年、西山祐司、小西義幸、山下明泰、酒井康行：第3回日本再生医療学会総会 (千葉), 2004.3.
- ラジアルフロー型リアクター灌流培養による高密度肝組織の in vitro 形成：花田三四郎、小島伸彦、迫田章義、酒井康行：第3回日本再生医療学会総会 (千葉), 2004.3.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

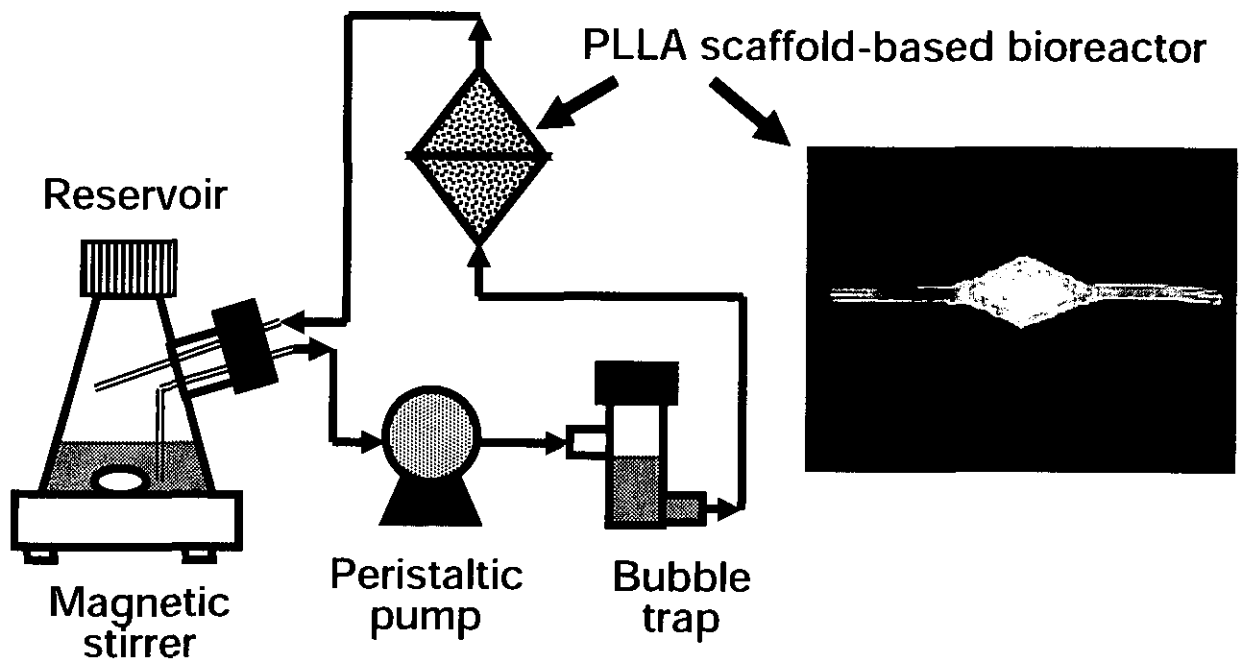


図1. PLLA三次元担体を用いた灌流培養システム.

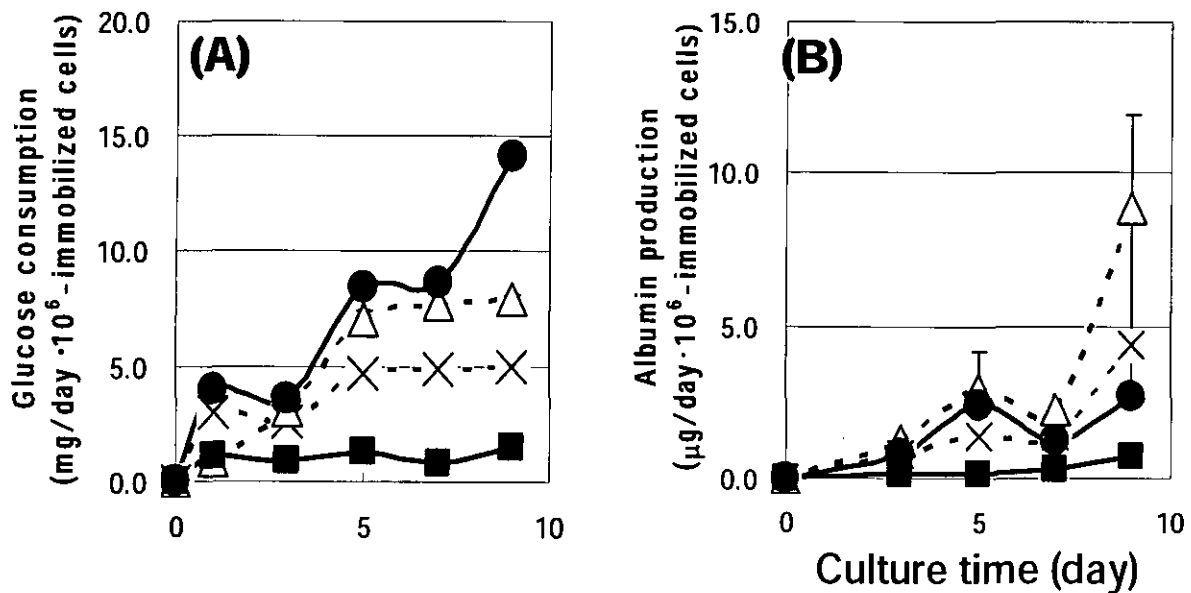


図2. 灌流培養におけるHep G2細胞のグルコース消費(A)とアルブミン分泌(B). 単層培養(×), PLLAディスク振盪培養(△), 流路構造有り灌流培養(●), 流路構造無し灌流培養(■).

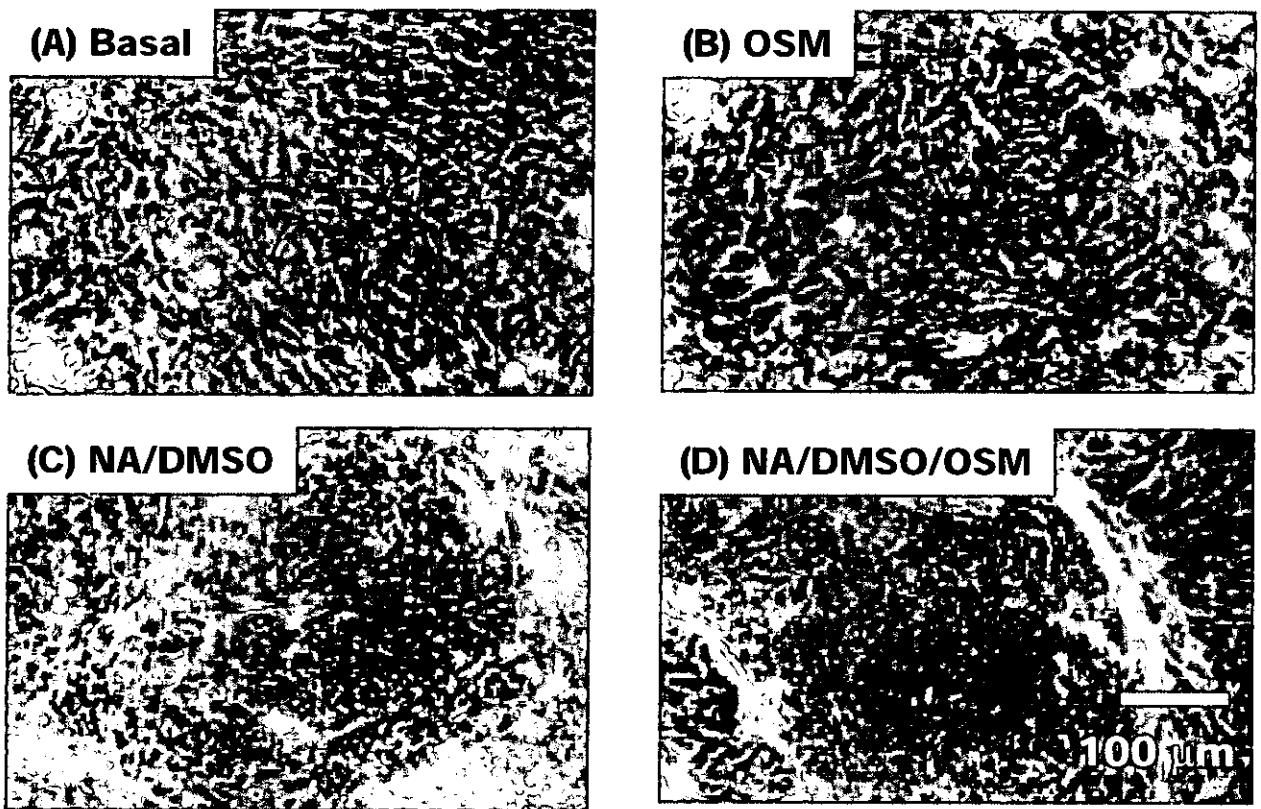


図 3. 4週間の単層培養における細胞形態.

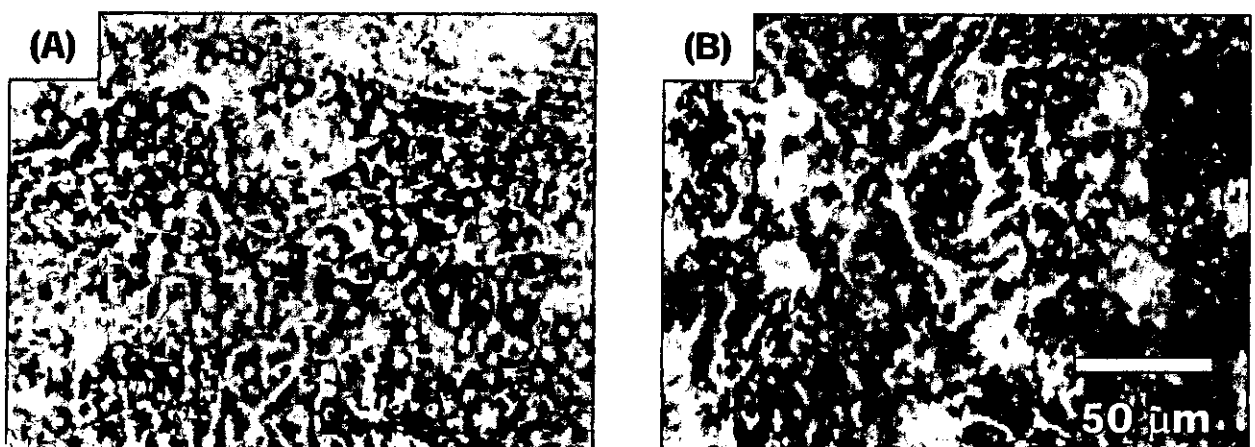


図 4. 4週間のNA/DMSO/OSM条件下での単層培養における細胞形態 (拡大). 典型的な小型肝細胞集団(A), より分化形態を示す細胞(B).